american diagnostica inc.
500 West Avenue, Stamford, CT 06902
Tel. (203) 602-7777 • Fax. (203) 602-2221

DVVtest® 10
DVVtest® 25
REF 810/825

DVVconfirm® 5
DVVconfirm® 10
REF 815/815L

IVD CE

8°C
2°

EC REP **american diagnostica GmbH**
Kaplaneigasse 35, D-64319 Pfungstadt, Germany

FRANCAIS

UTILISATION

Le *DVVtest*® d'American Diagnostica est un test dRVVT (Dilute Russell's Viper Venom Time) simplifié, proposé pour le dépistage ou la mise en évidence des anticorps de type anticoagulant lupique (Lupus Anticoagulant, LA) dans le plasma. En association avec le *DVVtest*, le *DVVconfirm*® d'American Diagnostica permet de confirmer la présence de ces LA. Ces deux tests sont des méthodes "un temps" et peuvent être utilisés en technique manuelle, semi-automatique ou automatique.

RÉSUMÉ

L'identification du Lupus Anticoagulant (LA) dans le plasma est un marqueur diagnostique du syndrome des antiphospholipides (Antiphospholipid Syndrome, APS) dont les signes cliniques peuvent être caractérisés par une thrombose artérielle/veineuse, des avortements spontanés récurrents, une thrombopénie et/ou des troubles neurologiques.[1] Le LA peut également être induit par l'administration de chlorpromazine, de procainamide, de thorazine et de certains antibiotiques. En 1952, Conley et Hartmann[2] ont décrit pour la première fois la présence de LA chez des patients souffrant de lupus érythémateux systémique (SLE). Il est maintenant généralement admis que le LA est détecté plus fréquemment chez les patients ne souffrant pas de SLE.[3] Les autoanticorps LA sont spécifiquement dirigés contre un groupe de protéines se liant aux phospholipides et comprenant la β2-glycoprotéine I (β2GPI), la prothrombine et l´annexine V, qui se complexent a différents phospholipides anioniques (comme par exemple la cardiolipine, l'acide phosphatidique et la phosphatidylsérine[4]). Les anticoagulants lupiques sont des immunoglobulines d'isotypes IgG, IgM et IgA qui prolongent *in vitro* certains des tests de coagulation des phospholipides dépendants (comme par exemple le temps de céphaline activé (TCA), le taux de prothrombine dilué (dPT), le temps de textarine ou le dRVVT). Le sous-comité scientifique de standardisation des anticoagulants lupiques et des anticorps "phospholipides dépendants" de la "International Society for Thrombosis and Hemostasis" a recommandé de diagnostiquer les LA par des tests de coagulation pour le screening et par un test de confirmation utilisant une forte concentration de phospholipids.[5] American Diagnostica Inc. a mis au point le *DVVtest* comme test de première intention pour le screening du LA et le *DVVconfirm* comme test complémentaire utilisant une forte concentration de phospholipides pour la confirmation. Le *DVVtest* et le *DVVconfirm* ont une composition permettant de minimiser l'effet de l'héparine afin de cibler au maximum la sensibilité et la spécificité pour le diagnostic du LA.

PRINCIPE

Le venin de vipère Russell active directement le facteur X en facteur Xa en présence de phospholipides et de calcium, ce qui génère de la thrombine et entraîne la formation d'un caillot visible dans le plasma. Cette activation directe permet de contourner les facteurs de la phase contact et intrinsèques de la cascade de la coagulation, et est insensible aux déficits en facteurs VIII, IX, XI et XII ou de leurs inhibiteurs respectifs. En présence d'une suspicion de LA, le *DVVtest* peut être réalisé même si le TCA est normal, car la concentration et le type de phospholipides du réactif permettent d'augmenter la sensibilité et la spécificité du test au LA.[6]

Le *DVVconfirm* confirme la présence de LA grâce à l'utilisation des mêmes réactifs que le *DVVtest* mais avec une concentration plus élevée de phospholipides.[7] Cela permet de corriger l'allongement du temps de coagulation induit par la présence de LA. En présence de LA, le temps de coagulation du *DVVconfirm* est plus court que celui du *DVVtest*. Le test est considéré comme positif pour la présence de LA quand le rapport *DVVtest* / *DVVconfirm* est ≥ à la zone de référence établie par le laboratoire (moyenne + 2 E.T.).

RÉACTIFS

Les réactifs *DVVtest* et *DVVconfirm* se présentent sous forme lyophilisée et contiennent un mélange original de venin de vipère Russell, de calcium et de phospholipides, stabilisé par des adjuvants inertes et des conservateurs. Conservés à 2 - 8°C et avant ouverture, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon.

Les réactifs *DVVtest* sont proposés en 2 conditionnements: La référence 810 contient 10 flacons, chaque flacon contenant les réactifs nécessaires pour 10 tests par méthode manuelle ou pour 20 tests par la plupart des méthodes automatiques. La référence 825 contient 10 flacons, chaque flacon contenant les réactifs nécessaires pour 25 tests par méthode manuelle ou pour 50 tests par la plupart des méthodes automatiques.

Les réactifs *DVVconfirm* sont proposés en 2 conditionnements: La référence 815 contient 10 flacons, chaque flacon contenant les réactifs nécessaires pour 5 tests par méthode manuelle ou pour 10 tests par la plupart des méthodes automatiques. La référence 815L contient 10 flacons, chaque flacon contenant les réactifs nécessaires pour 10 tests par méthode manuelle ou pour 20 tests par la plupart des méthodes automatiques.

RECUEIL ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Mélanger neuf volumes de sang et un volume de la forme dihydratée de citrate trisodique à 3,2 ou 3,8% (109 ou 129 mM). Si le taux d'hématocrite du patient est supérieur à 55%, les résultats des tests *DVVtest* et *DVVconfirm* peuvent être erronés et il est alors nécessaire d'effectuer un réajustement du sang à un anticoagulant de ratio.[8] Après mélange avec l'anticoagulant, centrifuger le sang pendant 10 mn à au moins 5000g. Le plasma normal et les plasmas de contrôle utilisés dans ces tests doivent être

impérativement pauvres en plaquettes (< 10^4 plaquettes/µL), plus particulièrement avant congélation car une forte quantité de plaquettes résiduelles pourrait masquer la présence de LA[5]. L'élimination des plaquettes peut être réalisée soit par double centrifugation, soit par filtration du plasma sur filtre de 0.22 µm[9]. Les échantillons ainsi préparés, peuvent être conservés à 2-8°C et doivent être testés dans les 4 heures. Les plasmas peuvent également être congelés rapidement à –70°C et sont alors stables pendant 6 mois. Les plasmas congelés doivent être rapidement décongelés à 37°C avant utilisation et être testés immédiatement ou dans les 2 heures suivantes s'ils sont conservés à 2-8°C.[8]

MATÉRIEL NÉCESSAIRE ET NON FOURNI

LAtrol™ : Plasma de contrôle anormal et normal (Références 816A ou 816N)[8].
Pipettes délivrant des volumes de 100 µL à 5,0 mL.
Eau distillée ou déminéralisée.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS ET STABILITE

REMARQUE: Le lyophilisat de *DVVconfirm* a un aspect poudreux; par contre, le lyophilisat de *DVVtest* peut avoir un aspect cristallin.

Reconstituer chaque flacon de réactif avec de l'eau distillée ou déminéralisée conformément aux instructions figurant sur l'étiquette.

REF	810	825	815	815L
Volume H_2O	2,0 mL	5,0 mL	1,0 mL	2,0 mL

Bien mélanger le réactif et le laisser stabiliser à température ambiante pendant au moins 15 minutes afin de permettre une totale dissolution. Une fois reconstitué, le réactif est stable pendant:

⌛	24 heures	7 jours	1 mois
🌡	de 20° à 25°C	de 2° à 8°C	-20°C

Les réactifs reconstitués peuvent être laissés en place dans l'instrument de mesure jusqu'à 24H à température ambiante, à condition que la température n'excède pas les valeurs indiquées.

Le réactif reconstitué peut être congelé et stocké en tubes plastiques pour assurer sa stabilité.

Les plasmas et les réactifs conservés à 2-8°C doivent être placés au bain-marie à 37°C, 10 mn au moins avant utilisation.

MODE OPÉRATOIRE

Méthode manuelle au bain-marie ou semi-automatique en utilisant le # ST4 ou le fibromètre BBL. Procédures disponibles sur demande.[10]

MÉTHODE AUTOMATIQUE

Le *DVVtest* et le *DVVconfirm* peuvent être utilisés sur divers automates. Le programme sélectionné sur l'instrument devra permettre de distribuer un même volume d'échantillon à tester et de réactif (ex : 100 µL de *DVVtest* ou *DVVconfirm* et 100 µL d'échantillon). Le plasma et le réactif doivent être préincubés à 37°C pendant au moins 2 minutes avant d'effectuer le test. Bien homogénéiser le réactif avant de l'ajouter au l'instrument. Le temps de coagulation du *DVVtest* de ce pool de plasmas normaux servira pour l'interprétation des résultats de l'échantillon à doser. Comme pour les méthodes manuelles et semi-automatiques déjà décrites, un échantillon de pool de plasmas normaux ou de LAtrol (REF 816N) devra être testé dans chaque série de dosages. Utiliser les circuits de réactifs spécifiques propres à chaque appareil et mettre un barreau magnétique dans le réservoir à réactifs quand cela est possible. Effectuer complètement la procédure de lavage et/ou de rinçage après avoir utilisé ces réactifs, en particulier sur les automates ne possédant pas de circuits réactifs spécifiques, avant de réaliser d'autres tests de coagulation ou chromogéniques. Consulter le mode d'emploi du fabriquant de l'instrument pour les instructions complètes concernant ces procédures.

Remarque : Tout échantillon s'avérant positif en *DVVtest* doit être testé une deuxième fois en utilisant le *DVVconfirm*.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les plasmas de contrôle LA normaux et anormaux doivent être testés pour chaque séries d'analyses, à chaque changement de personnel ou d'équipe de travail et tous les 40 échantillons.[11] Les plasmas de contrôle doivent être pauvres en plaquettes et contenir moins de 10^4 plaquettes/µL. Les plasmas de contrôle anormal et normal (REF 816A et 816N)[10] du LAtrol pour le LA peuvent être utilisés comme contrôle de qualité. Les valeurs obtenues pour ces plasmas doivent être situées dans la zone de valeurs de contrôle établie par le laboratoire.[8]

DETERMINATION DE LA ZONE NORMALE DE REFERENCE

Chaque laboratoire doit établir sa propre zone de référence (valeur moyenne ± 2 E.T.) pour les tests *DVVtest* et *DVVconfirm.* Un minimum de 20 donneurs sains (hommes et femmes représentatifs de l'âge adulte) doit être utilisé pour définir cette zone (voir VALEURS ATTENDUES).[8] Les plasmas normaux doivent être évalués dans les mêmes conditions que les plasmas à tester (frais ou congelés). Si uniquement des plasmas congelés sont utilisés, la zone de référence doit être établie à partir de plasmas congelés. Il est déconseillé de tester des populations mixtes de plasmas provenant à la fois d'échantillons frais et congelés pour déterminer les zones de référence ou réaliser des tests de routine. Il est conseillé d´établir une nouvelle zone de référence normale au minimum une fois par an, à chaque changement de lot de réactif, ou d'instruments. Afin de déterminer les variations journalières, analyser les données recueillies sur plusieurs jours.

INTERPRÉTATION ET RENDU DES RÉSULTATS (Voir arbre décisionnel pour la recherche du LA.)

Interprétation du *DVVtest*

Dans la mesure où la durée du *DVVtest* de l'échantillon des plasma est à l'intérieur de la plage de référence normale établie par le laboratoire (moyenne ± 2 S.D.), le test est réputé *négatif* au LA. Si la durée du *DVVtest* de l'échantillon de plasma est supérieure à 2 S.D. au-dessus de la moyenne de la plage normale de référence, le test est *positif* au LA.

REMARQUE : Un *DVVtest* positif n'indique pas nécessairement qu'il y ait des LA ou bien que le plasma puisse contenir une déficience du facteur II, V ou X. Si le *DVVtest* est positif, il y a lieu de confirmer la présence de LA en retestant avec *DVVconfirm* afin d'obtenir un rapport entre *DVVtest* et *DVVconfirm* (voir ci-dessous*)*. Le test *DVVconfirm* doit être effectué le même jour que le *DVVtest* et sur la même population de patients. Il faut effectuer des études mixtes afin de déterminer la présence d´une déficience de facteur.

Interprétation du *DVVconfirm*

Tout échantillon positif en *DVVtest* doit être vérifié en *DVVconfirm*. Les résultats obtenus avec le *DVVconfirm* peuvent être analysés soit en calculant le Rapport *DVVtest/DVVconfirm* ou le Rapport Normalisé.

1) Le Rapport *DVVtest/DVVconfirm* est exprimé par le rapport du temps de coagulation du *DVVtest* (en secondes) sur celui du *DVVconfirm* (en secondes):

Rapport *DVVtest/DVVconfirm* = Temps du *DVVtest* (s) / Temps du *DVVconfirm* (s)

Le Rapport *DVVtest/DVVconfirm* doit être déterminé pour les plasmas normaux de référence. Un rapport excédant de 2 E.T. la valeur normale établie par le laboratoire confirme la présence d'un LA positif. Si le Rapport *DVVtest/DVVconfirm* est dans la zone normale de référence établie par le laboratoire (rapport moyen ± 2 E.T.) le test est alors négatif.

2) Le Rapport Normalisé se calcule de la façon suivante:

$$\text{Rapport Normalisé} = \frac{\textit{DVVtest}\ (\text{échant.})/\textit{DVVtest}\ (\text{moy. norm. de réf.})}{\textit{DVVconfirm}\ (\text{échant.})/\textit{DVVconfirm}\ (\text{moy. norm. de réf.})}$$

A titre d'exemple uniquement:

DVVtest Patient:	58,9 secondes
DVVconfirm Patient:	32,2 secondes
DVVtest Moyen:	35,8 secondes
DVVconfirm Moyen:	32,8 secondes

$$\text{Rapport Normalisé} = \frac{58.9 \div 35.8}{32.2 \div 32.8} = \frac{1.64}{0.98} = 1.67$$

Interprétation des résultats en fonction du RAPPORT NORMALISE

Rapport Normalisé	Situation du LA
> 2,0	Forte présence de LA
1,5 à 2,0	Présence modérée de LA
1,2 à 1,5	Faible présence de LA

Les résultats des tests peuvent être rapportés comme étant soit positifs/négatifs en LA, ou bien exprimés par le Rapport *DVVtest/DVVconfirm* ou le Rapport Normalise. Dans l'éventualité d'une expression des résultats par le Rapport, il doit également être fait mention des valeurs de la zone de référence.

810-825CEFSD©ADI20070710

VALEURS ATTENDUES:

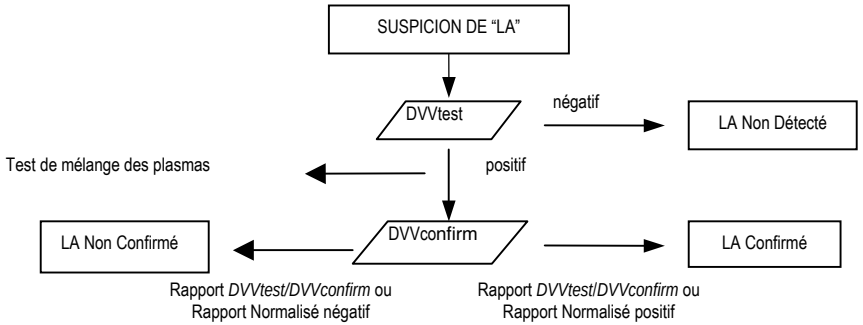
Valeurs normales de référence (± 2 E.T.)[12]

INSTRUMENT :	MLA 1000C	ST4	ACL 300+
Temps *DVVtest* (sec.)	28 - 45	29 - 51	28 – 47
Temps *DVVconfirm* (sec.)	30 - 40	21 - 46	28 – 40
RAPPORT *DVVtest / DVVconfirm*	0,77 – 1,21	0,95 – 1,47	0,83 – 1,35
n	21	25	20

Les zones de référence ont été définies par American Diagnostica Inc. en conformité avec les instructions NCCLS H21-A2.[8] Les donneurs étaient des hommes et des femmes de 20 à 65 ans, ayant des valeurs normales du TP et du TCA.

Ces résultats ne sont mentionnés qu'à titre indicatif. Les résultats peuvent varier d´un laboratoire à l'autre et chaque site doit établir sa propre zone de référence pour la méthode et l'instrument utilisé.

Arbre décisionnel pour la recherche du LA



LIMITES DE LA MÉTHODE

Ne pas utiliser des échantillons hémolysés, lipémiques ou ictériques sur des instruments à détection optique. Une méthode manuelle ou semi-automatique est alors conseillée. Ne pas effectuer les tests *DVVtest* ou *DVVconfirm* sur les échantillons de plasma hémolysés.

Les temps de coagulation du *DVVtest* et du *DVVconfirm* peuvent être allongés chez les patients avec déficits en facteurs II, V ou X. Le rapport ne restera cependant anormal qu'en présence de LA.

En présence d'inhibiteurs des facteurs II, V et X, la mise en évidence de LA ne pourra être réalisée chez les patients avec suspicion, du fait de l'allongement des temps de coagulation des tests *DVVtest* et *DVVconfirm*, dû à la présence d'inhibiteurs.

Si le *DVVtest* et le *DVVconfirm* sont réalisés sur des plasmas à titre élevé en facteur VIII (>200%), ces réactifs peuvent ne pas mettre en évidence la présence de LA et donner un résultat faussement négatif.[12]

Le *DVVtest* et le *DVVconfirm* contiennent des agents neutralisant l'héparine jusqu'à 1,0 UI/mL. Les plasmas ayant un taux d'héparine supérieur à 1,0 UI/mL peuvent donner des temps faussement allongés dans ces tests, et ne sont pas utilisables.

Certaines héparines de faible poids moléculaire (HBPM) peuvent fausser les résultats du *DVVtest*. Des études ont mis en évidence que la surcharge de plasmas en Fragmin® à 2,0 UI/mL n'influe pas sur les résultats de l'analyse. Un plasma surchargé en Lovenox® (enoxaparine sodique) à une concentration supérieure à 0,25 UI/mL interfère sur le résultat.[12]

Les traitements par la Coumadine ou par les autres anti-vitamines K peuvent entraîner un allongement des temps du *DVVtest* et du *DVVconfirm*. En général, le rapport ne sera en dehors de la zone normale qu'en présence de LA. Toutefois, quelques "faux positifs" peuvent être observés dans ces traitements.

Les échantillons doivent être analysés en utilisant au moins un autre test de coagulation pour le LA, car une seule analyse ne peut suffire pour la mise en évidence d´anticoagulants lupiques.[5]

CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES

Précision

Les tests *DVVtest* et *DVVconfirm* ont été effectués dans le cadre d´un programme de contrôle de qualité par American Diagnostica Inc. et par deux autres laboratoires indépendants. Le coefficient de variation (CV) obtenu sur les plasmas normaux était inférieur à 4,0% pour le *DVVtest* et à 5,0% pour le *DVVconfirm*. Pour les plasmas anormaux, le CV était inférieur à 6,5% pour le *DVVtest* et à 5,0% pour le *DVVconfirm*.[12]

Spécificité

Les réactifs du *DVVtest* et du *DVVconfirm* ont été testés[12] sur des plasmas normaux et anormaux.

ECHANTILLON DE PLASMA	*% DVVtest / DVVconfirm positifs*
Plasma avec Lupus anticoagulant	100 % (17/17)
Plasmas normaux	2,1 % (2/96)
Plasmas héparinés	0 % (0/2)
Plasmas Déficients en facteurs	0 % (0/8)
Plasma avec inhibiteur du facteur VIII	0 % (0/2)

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Harris, E. N., Asherson, R. A. and Hughes, G. R. V. Antiphospholipid antibodies - autoantibodies with a difference. *Ann Revs Med* 1988, 39: 261-271.
2. Conley, C. L. and Hartmann, R. C. A hemorrhagic disorder caused by a circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1952, 31: 621-622.
3. Triplett, D. A., Brandt, J. T. and Maas, R. L. The laboratory heterogeneity of lupus anticoagulants. *Arch Path Lab Med* 1985, 109: 946-951.
4. Thiagarajan, P., Shapiro, S. S. and DeMarco, L. Monoclonal immunoglobulin M lambda coagulation inhibitor with phospholipid specificity: Mechanism of a lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1980, 66: 397-405.
5. Brandt, J. T., Triplett, D. A., Alving, B. and Scharrer, I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants, an update: on behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulants/Antiphospholipid Antibodies of the ISTH *Thromb Haem* 1995, 74(6):1597-1603.
6. Exner, T., Papadopoulos, G. and Koutts, J. Use of a simplified dilute Russell viper venom time (dRVVT) confirms heterogeneity among 'Lupus Anticoagulants.' *Blood Coag Fibrinol* 1990, 1: 259-266.
7. Thiagarajan, P., Pengo, V. and Shapiro, S. S. The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. *Blood* 1986, 68: 869-874.
8. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays - Second Edition. *NCCLS Document H21-A2* December 1991, Vol. 11, No. 23.
9. Brandt, J. T. "Q & A". *CAP Today*, August 1992; Page 61.
10. Disponible chez American Diagnostica GmbH, Kaplaneigasse 35, D-64319 Pfungstadt, Allemagne ou votre distributeur local.
11. Passey, R. B. Walking the straight and narrow on quality control. *MLO* 1993, 2: 39-43.
12. Documentation interne, American Diagnostica Inc., Stamford, Connecticut 06902.

ESPAÑOL

USO PROPUESTO

El *DVVtest* es un ensayo simplificado de Veneno de Víbora Russell diluido (dRVVT) cuyo objetivo es detectar Anticoagulante Lúpico (AL) en el plasma del paciente. El ensayo *DVVconfirm* se utiliza para confirmar la presencia de AL en plasmas que han resultado positivos en el ensayo *DVVtest.* Tanto el *DVVtest* como el *DVVconfirm* constituyen ensayos de coagulación de un paso que pueden ser realizados mediante método manual, semiautomatizado o totalmente automatizado.

RESUMEN

La identificación del Anticoagulante Lúpico (AL) en el plasma constituye un paso decisivo en el diagnóstico del Síndrome Antifosfolípido (SAF). El SAF se caracteriza clínicamente por trombosis arterial o venosa, pérdidas fetales espontáneas y recurrentes, trombocitopenia y/o desórdenes neurológicos.[1] AL puede ser inducido a raíz de la administración de clorpromacina, procainamida, toracina y determinados antibióticos. En 1952 Conley y Hartmann[2] describieron por primera vez la presencia de AL en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES). Posteriormente se ha ido descubriendo que AL se suele determinar más comúnmente en pacientes que no padecen LES.[3] Los anticuerpos de AL se dirigen directa y específicamente contra una variedad de proteínas de unión fosfolipídica, entre las cuales se encuentran la beta 2 glicoproteína I (β2GPI), la protrombina y la anexina V que forman complejos con diferentes fosfolípidos aniónicos (p. ej. cardiolipina, fosfatidilinositol y fosfatildilserina[4]). Los Anticoagulantes Lúpicos son inmunoglobulinas de isotipos IgG, IgM y IgA que prolongan uno o varios de los ensayos fosfolípido dependientes de coagulación que se realizan in vitro (p. ej. el test de tromboplastina parcial con activador (APTT), el test de tiempo de protrombina diluida (dPT), el de tiempo de Textarin o el de veneno de víbora Russell diluido (dRVVT). La Sociedad Internacional para la Trombosis y la Hemostasis (Scientific Subcommittee "Criteria on Lupus Anticoagulants and Phospholipid-dependent Antibodies") recomienda para el diagnóstico de AL el empleo de un ensayo de screening basado en la coagulación junto con un ensayo de confirmación que contenga una alta concentración de fosfolípidos.[5] American Diagnostica Inc. ha desarrollado el *DVVtest* como ensayo primario de screening para detectar AL y *DVVconfirm* como ensayo complementario de alto contenido en fosfolípidos para confirmar su diagnóstico. Tanto *DVVtest* como *DVVconfirm* han sido especialmente formulados para reducir el efecto de la heparina a fin de maximizar la sensibilidad y la especificidad para diagnosticar AL.

810-825CEFSD©ADI20070710

PRINCIPIO DEL TEST

El reactivo *DVVtest* contiene Veneno de Víbora Russell que activa directamente el factor X convirtiéndolo en factor Xa en presencia de fosfolípidos y de calcio. El factor Xa convierte la protrombina en trombina, la cual convierte el fibrinógeno en fibrina originado la formación de coágulos en el plasma. Esta activación directa del factor X es independiente de los factores extrínsecos e intrínsecos en la cascada de coagulación, por lo tanto no se ve afectada por ninguna deficiencia de los factores VIII, IX, XI y XII, o de sus respectivos inhibidores. El *DVVtest* se considerará positivo cuando se determine una prolongación significativa del tiempo de coagulación fosfolípido dependiente (>2 desviaciones estándar por encima de la media normal del laboratorio). Si existe sospecha de AL, se recomienda realizar el *DVVtest* en muestras con APTT normal, puesto que la dilución y el tipo de fosfolípidos que contiene el reactivo del *DVVtest* aumenta la sensibilidad y la especificidad para AL.[6]

DVVconfirm es un ensayo de coagulación formulado con Veneno de Víbora Russell y una alta concentración de fosfolípidos para utilizar junto con el *DVVtest* con el objetivo de confirmar la presencia de AL en el plasma.[7] En un plasma que contenga AL, el tiempo de coagulación con *DVVconfirm* debería resultar significativamente inferior que al emplear *DVVtest*. La presencia de AL en las muestras de plasma queda confirmada cuando el ratio entre el tiempo de coagulación del *DVVtest* y el tiempo de coagulación del *DVVconfirm* es superior al rango normal del laboratorio (media del RATIO *DVVtest*/*DVVconfirm* ± 2 desviaciones estándar).

REACTIVOS

Los reactivos del *DVVtest* y del *DVVconfirm* se suministran liofilizados y consisten en mezclas patentadas de Veneno de Víbora Russell, calcio y fosfolípidos, así como aditivos y conservantes inertes. Conservándolos entre 2° y 8°C, el contenido de los viales sin abrir se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Los reactivos del *DVVtest* se suministran en dos tamaños diferentes de viales: a) REF 810 incluye 10 viales que contienen, cada uno, la cantidad de reactivo necesaria para realizar 20 ensayos con la mayoría de los métodos automatizados. b) REF 825 incluye 10 viales que contienen, cada uno, la cantidad de reactivo necesaria para realizar 50 ensayos con la mayoría de los métodos automatizados.

Los reactivos del *DVVconfirm* se suministran en dos tamaños diferentes de viales: a) REF 815 incluye 10 viales que contienen, cada uno, la cantidad de reactivo necesaria para realizar 10 ensayos con la mayoría de los métodos automatizados. b) REF 815L incluye 10 viales que contienen, cada uno, la cantidad de reactivo necesaria para realizar 20 ensayos con la mayoría de los métodos automatizados.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de sangre se pueden extraer empleando jeringas o tubos siliconados de vacío. Mezcle nueve partes de sangre con una parte de dihidrato del citrato trisódico (3,2 ó 3,8%) (109mM ó 129 mM). Si el valor hematocrito del paciente es superior al 55%, los resultados del *DVVtest* y del *DVVconfirm* pueden resultar imprecisos, pudiendo ser necesario ajustar la proporción entre la sangre y el anticoagulante.[8] Tras efectuar la mezcla, centrifugue las muestras a un *mínimo* de 5 000 x g durante 10 minutos para eliminar los trombocitos. El plasma pobre en trombocitos puede obtenerse también mediante filtrado de plasma utilizando un filtro de 0,22 micrones.[9] Es indispensable que se empleen plasmas pobres en trombocitos (< 10^4 trombocitos/μL), especialmente si van a ser congelados antes de ser analizados; de lo contrario, podrían obtenerse resultados inferiores que podrían ocultar la presencia de AL.[5] Manteniendo el plasma obtenido entre 2° y 8°C, puede ser analizado en el intervalo de las 4 horas siguientes. Como alternativa, el plasma puede ser congelado rápidamente y mantenido a -70°C durante un máximo de seis meses. El plasma congelado debe ser descongelado rápidamente a 37°C antes de su utilización, debiendo ser testado inmediatamente o pudiendo ser almacenado como máximo dos horas entre 2° y 8°C.[8]

MATERIALES NECESARIOS QUE NO SE SUMINISTRAN

Plasmas de control para LAtrol™ AL Normal (REF 816N) y Anormal (REF 816A)[8] (o plasmas de control equivalentes)
Pipetas para dispensar volúmenes de 100 μL a 5,0 mL
Agua purificada desionizada o destilada

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

NOTA: El liofilizado de *DVVconfirm* tiene la apariencia de polvo; el liofilizado del *DVVtest* puede tener una apariencia cristalina.

Reconstituya cada vial de reactivos con agua desionizada siguiendo las instrucciones de la etiqueta.

REF	810	825	815	815L
Volumen H_2O	2,0 mL	5,0 mL	1,0 mL	2,0 mL

Después de añadir el agua, mezcle bien el reactivo y manténgalo a temperatura ambiente durante 15 minutos como mínimo para asegurar la disolución completa. Una vez reconstituidos, el reactivo se mantendrá estable durante:

⌛	24 horas	7 días	1 mes
🌡	entre 20° y 25°C	entre 2° y 8°C	-20°C

El reactivo reconstituido puede ser recuperado del analizador si no ha sido superado el tiempo de estabilidad de 24 horas a temperatura ambiente. El reactivo reconstituido puede ser congelado en tubos de almacenamiento de plástico para asegurar su estabilidad. Cuando vaya a utilizar un reactivo congelado, proceda a su descongelación a 37°C durante 10 minutos como mínimo y agítelo bien antes de usar.

PROCEDIMIENTO

Procedimiento manual (p. ej. método de tubo inclinado) o método semiautomatizado empleando el ST4 o el fibrómetro BBL

Solicite la descripción detallada de los procedimientos.[10]

Método automatizado

El *DVVtest* y el *DVVconfirm* pueden ser realizados con la mayoría de los analizadores automáticos. Sea cual fuere el instrumento seleccionado, se empleará el mismo volumen de reactivo que de muestra de plasma, por ejemplo 100 μL de reactivo *DVVtest* o de reactivo *DVVconfirm* y 100 μL de plasma. Tanto el reactivo como la muestra de plasma se deben incubar a 37°C durante 2 minutos como mínimo, antes de realizar el ensayo. Mezcle bien el reactivo reconstituido antes de agregarlo al plasma. Los resultados del *DVVtest* y el *DVVconfirm* son indicados en unidades de tiempo (segundos). Latrol (REF 816N) puede ser utilizado como plasma de control normal para los ensayos *DVVtest* y *DVVconfirm*. (Véase "Interpretación e informe de los resultados".) Coloque varillas magnéticas para agitación en el depósito de reactivos y de ser posible, añada los reactivos empleando tubos flexibles aparte. Después de utilizar los reactivos, realice un enjuagado y/o lavado del aparato, especialmente si no dispone de tubos flexibles aparte para el suministro de los reactivos, antes de volverlo a utilizar para otro ensayo de coagulación o ensayo cromogénico. Para los ajustes precisos del aparato, véase el Manual de instrucciones que suministra su fabricante.

Nota: Toda muestra que resulte positiva al realizar el ensayo *DVVtest* debe ser nuevamente testado utilizando *DVVconfirm*.

CONTROL DE CALIDAD

Para cada serie de ensayos se debe realizar un control normal y un control anormal; también se llevarán a cabo en el caso de cambio de personal o de turno, así como cada 40 muestras.[11] Los plasmas de control deben ser pobres en trombocitos (< 10^4 trombocitos/μL). Los plasmas de control LAtrol AL Normal y Anormal (REF 816N y 816A)[10] pueden ser utilizados para controles de calidad . Antes de analizar las muestras de los pacientes, los plasmas de control de AL normal y anormal deben haber arrojado resultados comprendidos dentro de los rangos de control establecidos en el laboratorio.[8]

RANGO NORMAL DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe establecer su propio rango normal para el *DVVtest* y el *DVVconfirm* (media ± 2 desviaciones estándar). Para ello se utilizarán un mínimo de 20 plasmas de donantes sanos (aproximadamente el mismo número de hombres y mujeres adultos, véase VALORES PREVISTOS).[8] Al establecer el rango normal de referencia, maneje las muestras de plasma normal exactamente igual que las muestras por analizar. Si únicamente se analizan muestras congeladas, los rangos normales se establecerán exclusivamente con muestras normales congeladas. Tanto para determinar los rangos de referencia como para realizar los tests de rutina, se deberían utilizar o bien únicamente plasmas frescos o bien sólo plasmas previamente congelados. Cuando se cambie el lote de reactivos o el analizador, y si esto no procede, una vez al año como mínimo, se debe establecer un nuevo rango normal de referencia. Obtenga los datos a lo largo de varios días para determinar también la variación entre diversas series de ensayos (variación inter ensayo).

INTERPRETACIÓN E INFORME DE LOS RESULTADOS (Véase el diagrama de confirmación de AL)

Resultados del *DVVtest*

Si el plasma del paciente arroja un resultado situado dentro del rango normal establecido por el laboratorio para el *DVVtest* (media ± 2 desviaciones estándar) el test para AL es negativo. Si el resultado del *DVVtest* es superior al rango normal el test es positivo para AL.

NOTA: Un *DVVtest* positivo indica o bien la presencia de AL o bien alguna deficiencia de factor II, V o X. Si el *DVVtest* resulta positivo, la presencia de AL debe ser confirmada realizando nuevamente el ensayo con el *DVVconfirm* para obtener un RATIO *DVVtest/DVVconfirm* (*véase abajo*). El ensayo *DVVconfirm* debe ser realizado con la misma muestra de paciente y el mismo día que el *DVVtest*. Las posibles deficiencias de factores se determinarán mediante pruebas de mezclas.

Resultados del DVVconfirm

Si una muestra ha resultado ser positiva con el *DVVtest*, proceda a realizar el ensayo *DVVconfirm*. Los resultados de *DVVconfirm* pueden ser reportados como RATIO *DVVtest/DVVconfirm* o como RATIO NORMALIZADO.

1) El RATIO *DVVtest/DVVconfirm* se calcula dividiendo el tiempo determinado con el *DVVtest* (en segundos) entre el tiempo determinado con el *DVVconfirm* (en segundos):

RATIO *DVVtest/DVVconfirm* = *DVVtest* (seg.) ÷ *DVVconfirm* (seg.)

El RATIO *DVVtest/DVVconfirm* debe ser determinado para plasmas normales de referencia. Si el RATIO *DVVtest/DVVconfirm* del plasma del paciente es superior a 2 desviaciones estándar por encima de la referencia normal establecida en el laboratorio para el RATIO *DVVtest/DVVconfirm*, queda confirmado que el test de AL es positivo. Si el ratio del *DVVtest/DVVconfirm* se sitúa en el rango normal para el ratio, el test es negativo para AL, y hay presencia de otras anomalías.

2) El RATIO NORMALIZADO se calcula del siguiente modo:

$$\text{RATIO NORMALIZADO} = \frac{\textit{DVVtest}\ (\text{muestra})/\textit{DVVtest}\ (\text{media del rango normal})}{\textit{DVVconfirm}\ (\text{muestra})/\textit{DVVconfirm}\ (\text{media del rango normal})}$$

Ejemplo:

Muestra *DVVtest*:	58,9 segundos
Muestra *DVVconfirm*:	32,2 segundos
Media del *DVVtest*:	35,8 segundos
Media del *DVVconfirm*:	32,8 segundos

$$\text{RATIO Normalizado} = \frac{58.9 \div 35.8}{32.2 \div 32.8} = \frac{1.64}{0.98} = 1.67$$

Interpretación de resultados del RATIO NORMALIZADO

RATIO Normalizado	Status AL
> 2,0	Alta presencia de AL
de 1,5 a 2,0	Presencia moderada de AL
de 1,2 a 1,5	Ligera presencia de AL

Los resultados del ensayo se pueden expresar como "positivos/negativos" para el Anticoagulante Lúpico, o bien mediante indicación del RATIO *DVVtest/DVVconfirm* o el RATIO NORMALIZADO. Si se expresan los resultados en ratios, también debe indicarse el valor correspondiente al rango de referencia.

VALORES PREVISTOS

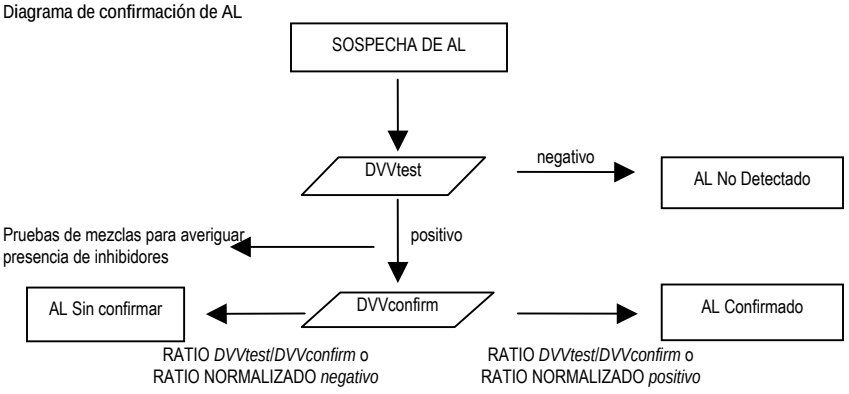
Rangos normales de referencia (± 2 desviaciones estándar)[12]

INSTRUMENTO:	MLA 1000C	ST4	ACL 300+
Tiempo *DVVtest* (seg.)	28 - 45	29 - 51	28 – 47
Tiempo *DVVconfirm* (seg.)	30 - 40	21 - 46	28 – 40
RATIO *DVVtest/DVVconfirm*	0,77 – 1,21	0,95 – 1,47	0,83 – 1,35
n	21	25	20

Los rangos de referencia han sido obtenidos por American Diagnostica Inc. de acuerdo al Documento NCCLS H21-A2.[8] Los donantes fueron adultos mujeres y hombres con valores normales de PT y APTT.

Estos resultados sólo se deben considerar como ejemplo. Los resultados variarán según el laboratorio; por ello cada laboratorio debe determinar sus propios rangos de referencia normales para todos los instrumentos y métodos empleados.

Diagrama de confirmación de AL



LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

No analice muestras hemolizadas, lipémicas o ictéricas.

Las muestras con sospecha de deficiencia de factores II, V, o X deben ser analizadas realizando pruebas de mezclas.

Las muestras con sospecha de contener inhibidores de los factores II, V, o X pueden arrojar falsos resultados positivos.

Si el *DVVtest* se realiza con plasmas que contengan altas concentraciones de factor VIII (>200%), el reactivo puede no llegar a identificar la presencia de AL, arrojando un falso negativo.[12]

DVVtest y *DVVconfirm* contienen agentes que neutralizan hasta 1,0 U/mL de heparina. Los plasmas que contienen una concentración de heparina superior a 1,0 U/mL pueden arrojar resultados elevados si son analizados con estos tests.

Algunas heparinas de bajo peso molecular (LMWH) pueden interferir con el *DVVtest*. Ciertos estudios han mostrado que al adición de 2,0 unidades/mL de Fragmin® (inyección de dalteparina sódica) al plasma no interfiere en los resultados del ensayo. En plasmas a los que se les ha añadido Lovenox® (inyección de enoxaparina sódica) en concentraciones superiores a las 0,25 unidades/mL los resultados del ensayo sí se ven interferidos.[12]

La Coumadina y otros antagonistas de la vitamina K pueden prolongar los tiempos de *DVVtest* y *DVVconfirm*. El resultado del RATIO *DVVtest/DVVconfirm*, sin embargo, se mantendrá fuera del rango normal si hay presencia de Anticoagulantes Lúpicos.

Las muestras deben ser testadas empleando por lo menos otro test diferente de AL basado en la coagulación, dado que mediante ningún único ensayo de AL se consigue una identificación absoluta de la presencia de Anticoagulantes Lúpicos el plasma.[5]

CARACTERÍSTICAS DE LAS PRESTACIONES

Precisión

Los ensayos *DVVtest* y *DVVconfirm* han sido sometidos a un programa de control de calidad realizado por American Diagnostica Inc. y dos laboratorios independientes. El coeficiente de variación global (CV) para plasmas normales fue inferior a 4,0% para el *DVVtest* e inferior a 5,0% para el *DVVconfirm*. Para plasmas anormales el CV global fue inferior a 6,5% para el *DVVtest* e inferior a 5,0% para el *DVVconfirm*.[12]

Especificidad

Los reactivos de *DVVtest* y *DVVconfirm* han sido testados[12] utilizando plasmas normales y anormales, tal y como se describe a continuación.

MUESTRA DE PLASMA	*DVVtest/DVVconfirm* positivo
Plasmas con test de AL positivo	100% (17/17)
Plasmas normales	2,1% (2/96)
Plasmas heparinizados	0% (0/2)
Plasmas con deficiencia de factores	0% (0/8)
Plasmas con inhibidor del factor VIII	0% (0/2)

REFERENCES

1. Harris, E. N., Asherson, R. A. and Hughes, G. R. V. Antiphospholipid antibodies - autoantibodies with a difference. *Ann Revs Med* 1988, 39: 261-271.
2. Conley, C. L. and Hartmann, R. C. A hemorrhagic disorder caused by a circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1952, 31: 621-622.
3. Triplett, D. A., Brandt, J. T. and Maas, R. L. The laboratory heterogeneity of lupus anticoagulants. *Arch Path Lab Med* 1985, 109: 946-951.
4. Thiagarajan, P., Shapiro, S. S. and DeMarco, L. Monoclonal immunoglobulin M lambda coagulation inhibitor with phospholipid specificity: Mechanism of a lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1980, 66: 397-405.
5. Brandt, J. T., Triplett, D. A., Alving, B. and Scharrer, I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants, an update: on behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulants/Antiphospholipid Antibodies of the ISTH *Thromb Haem* 1995, 74(6): 1597-1603.
6. Exner, T., Papadopoulos, G. and Koutts, J. Use of a simplified dilute Russell viper venom time (dRVVT) confirms heterogeneity among 'Lupus Anticoagulants.' *Blood Coag Fibrinol* 1990, 1: 259-266.
7. Thiagarajan, P., Pengo, V. and Shapiro, S. S. The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. *Blood* 1986, 68: 869-874.
8. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays - Second Edition. *NCCLS Document H21-A2* December 1991, Vol. 11, No. 23.
9. Brandt, J. T. "Q & A". *CAP Today*, August 1992, Page 61.
10. Disponible en American Diagnostica GmbH, Kaplaneigasse 35, D-64319 Pfungstadt, Alemania o su distribuidor local.
11. Passey, R. B. Walking the straight and narrow on quality control. *MLO* 1993, 2: 39-43.
12. Datos registrados a disposición de American Diagnostica Inc., Stamford, Connecticut 06902. EEUU.

810-825CEFSD©ADI20070710

DANSK

Metodebeskrivelse til dagligt brug

ANVENDELSESOMRÅDE

DVVtest® er et forenklet "dilute Russell's Viper Venom Time (dRVVT)" test til bestemmelse af Lupus Antikoagulans (LA) i patient plasma. *DVVconfirm®* anvendes til at bekræfte at LA forefindes i det plasma der er testet positivt i DVVTest.Begge metoder er 1-trins koagulationstests som kan udføres manuelt eller med halv- respektive helautomastiske metoder.

SAMMENFATNING

Identifikationen af Lupus Antikoagulans (LA) i plasma er et diagnostisk stempel af det Antifosfolipide Syndrom (APS) som er klinisk karakteriseret ved arteriel/venøs trombose, recidiv spontan tab af foster (spontan abort), trombocytopeni og/eller neurologiske forstyrrelser. LA kan også induceres som et resultat af brugen af klorpromazin, procainamid, torazin og visse antibiotika. I 1952 beskrev Conley & Hartmann som de første tilstedeværelsen af LA i patienter med Systemisk Lupus Erthymatosis (SLE). Det er nu anerkendt at LA findes oftere i patienter som ikke har SLE. LA auto-antistoffer er specifikt rettet mod en afart af fosforlipid bindende proteiner der inkluderer β2-glycoprotein I (β2GPI), protrombin, og annexin V, som er komplekst bundet til forskellige anioniske fosfolipider (f.eks. kardiolipiner, fosfatidylinotisol og fosfatidylserin). Lupus Antikoagulans er immunoglobuliner af IgG, IgM of IgA isotyper som forlænger et eller flere af de *in vitro* fosfolipid afhængige koagulations test (f.eks. aktiveret delvis tromboplastin tid (APTT, opløst prothrombin tid (dPT), Textarin tid eller dRVVT). Det Internationale Forening for Trombose og Hemostase, Det Videnskabelige Undernævns Kriterie for Lupus Antikoagulans og Fosfolipid-afhængige antistoffer har anbefalet at LA bør diagnosticeres ved at anvende koagulationsbaserede screening tests og en bekræftende test, som indeholder en høj fosfolipid koncentration. American Diagnostica Inc. har udviklet DVVTest som et primært screening diagnostisk test for LA og DVVconfirm som et ledsagende høj fosfolipid-indholdende test til at bekræfte LA diagnosen. DVVTest og DVVconfirm er specielt blandet til at reducere heparin effekten for at maksimere sensitiviteten og specificiteten af LA diagnosticering.

TESTPRINCIP

DVVTest reagens indeholder Russell's Viper Venom som direkte aktiverer Factor X til Factor Xa i nærvær af fosfolipider og calcium. Factor Xa kløver protrombin til trombin, som konverterer fibrinogen til fibrin som så leder hen på en målbar koagulatinsformation i plasma. Denne direkte aktivering af Factor Xa forgrener Contact og Intrinsic baner i koagulationskaskader og ekskluderer derved indblanding af fejl fra Factor VIII, IX,XI og XII, eller deres respektive inhibitorer. En positiv DVVTest er indikeret ved en mærkbar forlængelse af det fosfolipid-afhængige koagulationstid (>2 standard afvigelser over laboratoriets normal reference). Hvis patienten er mistænkt for at have LA, kan DVVtesten også benyttes på prøver med en normal APTT fordi opløsningen og typen af fosfolipider der er indeholdt i DVVtest reagensen forøger testens LA sensitivitet og specificitet.

DVVconfirm er det høje fosfolipid der indeholder koagulations analyse der er brugt i Konjunktion med DVVtest til at bekræfte tilstedeværelsen af LA i plasma. DVVconfirm er blandet med Russell's Viper Venom og en høj koncentration af fosfolipider. Koagulationstiden for plasma der indeholder LA burde være mærkbart kortere med DVVconfirm ved sammenligning med DVVtest. Tilstedeværelsen af LA i plasmaprøver er bekræftet, når forholdet mellem DVVtest koagulationstid og DVVconfirm koagulationstid er større end målområde for laboratoriets normale reference DVVTest/DVVconfirm RATIO (normalforhold ±2 S.D.)

REAGENSER

DVVtest og DVVconfirm reagenserne er frysetørrede og foreligger som optimerede blandinger af Russell's Viper Venom, kalcium og fosfolipid samt visse inerte og holdbarhedssøgende tilsætnings-stoffer. Uåbnede flasker som opbevares ved 2-8°C er holdbare til udløbsdatoen som er markeret på etiketten.

DVVtest er pakket i 2 størrelser: REF 810, indeholder 10 vials, et enkelt vial indeholder reagens for 20 prøver som udført ved de mest automatiserede metoder; REF825, indeholder 10 vials, hver enkelt vial indeholder reagens nok til 50 prøver som er udført ved de mest automatiserede metoder.

DVVconfirm er pakket i 2 størrelser: REF 815, indeholder 10 vials, et enkelt vial indeholder reagens til 10 prøver som udført ved de mest automatiserede metoder; REF815L, indeholder 10 vials, hver enkelt vial indeholder reagens nok til 20 prøver som er udført ved de mest automatiserede metoder.

PRØVETAGNING og TILBEREDNING

Blodprøver kan tages med en sprøjte eller silikoniserede vakuum rør. Bland 9 dele blod med en del af 3.2 eller 3,8% trinatriumcitrat-dihydrat. Hvis patientens hematokrit er højere end 55%, bør citratmængden formindskes proportionelt for at undgå indvirkning på resultatet. Efter blandingen centrifugeres prøven ved 5,000 x g i 10 minutter. Det er meget vigtigt at al plasma der testes med denne reagens er "platelet poor" dvs, at det har færre end 10 trombocyter/µL. Dette gælder specielt hvis plasmaen skal nedfryses, idet kan testresultaterne forværres hvilket kunne maskere LA til-stedeværelsen . Dette kan opnås ved centrifugering (se ovenfor) eller ved at filtrere plasmaen gennem et 0,22 micron filter. Det samlede plasma kan da siden opbevares ved 2-8°C men bør afprøves/testes indenfor 4 timer. Alternativt kan plasmaen nedfryses til -70°C og

opbevares i et halvt år. Nedfrosset plasma skal hurtigt tøs op til 37°C før brug og afprøves omgående, eller bør ikke opbevares længere end 2 timer ved 2-8°C i optøet stand før afprøvning.

MATERIALE SOM BEHØVES FØR ANALYSEARBEJDET

LAtrol™, LA normal (REF 816N) respektive unormal kontrolplasma (REF816N) eller lignende Pipetter til volumen mellem 100 µL og 5,0ml rent, deioniseret eller destilleret vand.

REAGENSENS OPLØSNING OG STABILITET

Bemærk: DVVconfirm lyoph. har et pudderagtigt udseende, dog kan DVVtest lyoph.forekomme krystallint. Opløs reagenset i det volumen destilleret vand som er angivet på etiketten. Blandes ordentligt og lad det stå i mindst 15 min. ved stuetemperatur, så opløsningen bliver fuldstændig.

Opløs reagenset i det volumen destilleret vand som er angivet på etiketten. Blandes ordentligt og lad det stå i mindst 15 min. ved stuetemperatur, så opløsningen bliver fuldstændig.

REF	810	825	815	815L
Volume H_2O	2.0 mL	5.0 mL	1.0 mL	2.0 mL

Reagenset er stabilt: i 24 timer ved 20-25°C, 7 dage ved 2-8°C, 1 måned ved -20°C Rekonstitueret reagens kan blive genvundet fra instrument reagens reservoir forudsat at 24-timers stuetemperaturs stabilitet ikke er overskredet. Rekonstitueret reagens kan nedfryses i plastik opbevarings rør for at sikre stabilitet.Nedfrosset reagens bør stå i mindst 10 minutter ved 37°C, derefter "vortexes" inden brug.

⌛	24 hours	7 days	1 month
🌡	20° to 25°C	2° to 8°C	-20°C

METODEUDFØRELSE

Manuel "vejemetode" eller halvautomatisk metode ned ST4 eller BBL Fibrometer

Beskrivelser findes om ønsket.

Automatiske metoder

DVVtest og DVVconfirm kan udføres på de fleste automatiske koagulationstidsbestemmelses- maskiner. Apparaterne stilles ind på at levere lige dele volumen (f.eks 100 µL) prøve og reagens. Både prøve og reagens skal inkuberes ved 37°C i mindst 2 minutter inden testen startes. Bland det rekonstituerede materiale grundigt inden det sættes til apparaturet. Resultatet angives i sekunder (koagulationstid). Som kontrol anbefales LAtrol REF 816N (normal) som bør bruges ved udførsel af DVVtest og DVVconfirm.(Se fortolkningen ad resultaterne for determinationen af LA negativitet og LA positivitet.) Anvend helst en speciel slange for at mindske kontaminations-risiko for denne reagens. Glem ikke magnetomrøre i reagensreservoirerne. Udfør a rensning og/eller en vaskning procedure efter brug af reagensen, specielt for de instrumenter som ikke har speciel reagens slange, før udførsel andre koagulations-eller kromogene prøver. Konsulter de respektive leverandørers instrument manual for fuldstændige maskinelle instrukser.

OBS! Alle prøver der er testet positive med DVVtest skal testes med DVVconfirm (som har et overskud af fosfolipid) for at man med nogen sikkerhed skal kunne diagnosticere LA.

KVALITETSKONTROL

Både normal og unormal LA kontrolplasma skal indgå i hver analyse serie med et skift af personale eller skiftehold, og for hver 40. prøve. Al kontrol plasma skal indeholde færre end 10 trombocyter/µL. LAtrol LA Normal og Unormal kontrol plasma (REF 816N og REF 816 A) kan bruges som kvalitetskontrol. Værdier både for normal og unormal skal ligge indenfor de intervaller som laboratoriet selv har bestemt, inden patient plasma analyseres.

REFERENCEOMRÅDE FOR NORMAL PLASMA

Hvert laboratorium skal bestemme deres eget referenceområde for DVVtest og DVVconfirm som har en middelværdi ±2SD. Mindst 20 plasma fra et repræsentativt område (køn, alder) af raske bloddonorer bør indgå. Det er vigtigt at normalværdi plasma behandles *på same måde* som prøve plasma kommer til at blive behandlet. Hvis frosne prøver er testet separate skal normalværdierne være fastsat kun for frosne prøver. Det kan ikke anbefales at blande prøverne, dvs. at analysere begge prøver som friske eller nedfrosne i vilkårlig rækkefølge. Et nyt reference område skal tages frem ved enhver forandring f.eks. en bytning af reagens Lot #, ændringer på apparat og minimum én gang om året hvad der kommer først). Opnå daglige data over flere dage for at bestemme en dag-dag variation.

FORTOLKNING & RAPPORTERING (Se resultaterne: LA Decision Flow Chart)

DVVTest Resultat

Hvis koagulationsprøven ligger indenfor referenceområdet (middelværdi±2SD), så er prøven LA negativ, men hvis DVVTest tiden for prøveplasmaet er større end middelværdien på de 2SD, så er prøven LA positiv.

Bemærkning: En positiv DVVTest indikerer enten at LA er til stede eller at plasmaet kan indeholde en Factor II, V eller X mangel. Når DVVtesten er positiv bør LA tilstedeværelsen blive bekræftet. Reteste ved at bruge DVVconfirm for at opnå en DVVtest/DVVconfirm kvote. DVVConfirm prøven skal udføres på samme patient prøve samme dag som DVVtesten er blevet udført. Blandede studier skal udføres for at bestemme tilstedeværelsen af en faktor mangel.

DVVconfirm Resultat

Hvis prøven er testet positiv for DVV test, så skal DVVConfirm testen udføres. Resultaterne fra DVVconfirm kan rapporteres ved at bruge DVVTest/DVVconfirm kvote eller normaliseret kvote.

1) Kvoten DVVtest/DVVconfirm (sec.) benævnes KVOT. DVVtest/DVVconfirm beregnes ved at dividere DVVtest tid (sek.) med DVVconfirm tid (sek.)som følger:

DVVtest/DVVconfirm Kvote= DVVtest(sek.) ÷ DVVConfirm (sek.)

DVVtest/DVVconfirm KVOTE skal være bestemt for normal reference plasma. En resulterende kvote af test plasma der er større end 2 standard afvigelser over laboratoriets normale reference niveau *DVVtest/DVVconfirm* KVOTE bekræfter en positiv LA test. Hvis *DVVtest/DVVconfirm* kvote resultatet er indenfor normal reference middelværdi, så er prøven LA negativ eller at andre afvigelser er tilstede.

2) Normalkvoten beregnes som følger:

$$\text{NORMALKVOTE} = \frac{\textit{DVVtest}\text{ (prøve)}/\textit{DVVtest}\text{ (normal reference værdi)}}{\textit{DVVconfirm}\text{ (prøve)}/\textit{DVVconfirm}\text{ (normal reference værdi)}}$$

Example Only:

Patient *DVVtest*:	58.9 seconds
Patient *DVVconfirm*:	32.2 seconds
Mean *DVVtest*:	35.8 seconds
Mean *DVVconfirm*:	32.8 seconds

$$\text{NORMALKVOTE} = \frac{58.9 \div 35.8}{32.2 \div 32.8} = \frac{1.64}{0.98} = 1.67$$

Fortolkning af normaliseret kvote resultater:

NORMALKVOTE	LA Status
> 2.0	Stærkt Positiv
1.5 – 2.0	Moderat Positive
1.2 – 1.5	Svagt Positive

Testresultaterne kan rapporteres som enten værende positiv eller negativ for LA, eller ved atrapportere DVVtest/DVVconfirm kvote eller normaliseret kvote. Ved rapportering af kvote resultater skal værdien for referenceområdet også rapporteres.

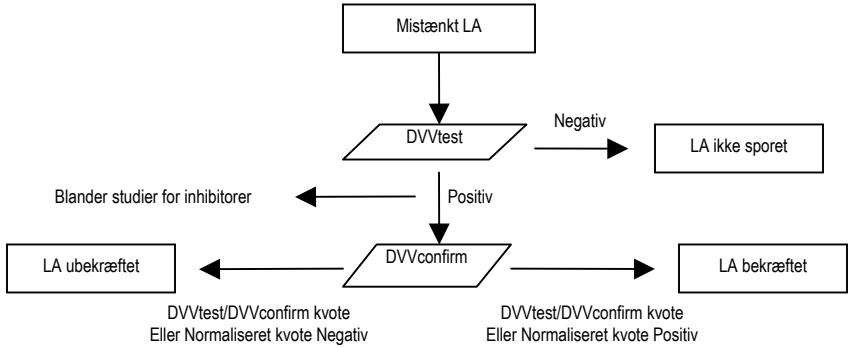
FORVENTEDE VÆRDIER

Normal Reference Område (± 2SD)

INSTRUMENT	MLA 1000C	ST4	ACL 300+
DVVtest (sek)	28 - 45	29 - 51	28 – 47
DVVconfirm (sek)	30 - 40	21 - 46	28 – 40
DVVtest/DVVconfirm Kvote	0,77 – 1,21	0,95 – 1,47	0,83 – 1,35
n	21	25	20

Reference områder var generet af AMDI i overensstemmelse med NCCLS Dokument H21-A2. Donorer der har deltaget har både været mænd og kvinder, i forskellige aldre og have normale PT og APPT værdier. Disse resultater er kun vejledende. Resultater vil altid variere fra et laboratorium til et andet og ethvert test område må selv bestemme deres normal reference område for alle instrumenter og metoder der anvendes.

LA Decision Flow Chart



METODEBEGRÆNSNINGER

Undgå at teste hæmolyserede, lipemiske eller icteriske plasmer.

Prøver der er mistænkt for mangler af Factor II, V eller X bør testes ved brug af blandede studier.

Prøver der er mistænkt for indhold af Factor II,V eller X inhibitorer kan give falske positive resultater.

Hvis DVVtest er anvendt på plasma indeholdende høje værdier af Factor VIII (>200%) kan reagenset ikke identificere LA tilstedeværelsen og kan derfor give et falskt negativ LA.

DVVtest og DVVconfirm indeholder stoffer som kan neutralisere standard ufraktioneret heparin op til og inkluderer 1,0 U/ml. Plasma indeholdende heparin niveauer højere end 1.0 U/ml kan give forhøjede resultater med disse tests.

Visse lav molekylær vægt hepariner (LMWH) kan influere DVVtesten. Undersøgelser har vist, at plasma tilsat med 2.0 units/ml Fragmin® (dalteparin sodium indsprøjtning) ikke blandede sig med prøve resultater. Plasma der er tilsat Lovenox® (enoxaparin sodium indsprøjtning) med koncentrationer højere end 0.25 U/ml blander sig dog med prøve resultater.

Coumadin eller andre Vitamin K antigonister kan forlænge DVVtest og DVVconfirm tider. DVVtest/DVVconfirm KVOTE resultat vil dog stadig være udenfor normalområdet hvis LA er til stede.

Det anbefales at anvende mindst én anden koagulationsbaseret LA test, idet ***<u>én enkelt LA prove ikke</u>*** afgjort kan identificere tilstedeværelsen af Lupus Antikoagulans i hvert enkelt prøve plasma.

FORVENTEDE RESULTATER

Præcision

DVVtest og DVVconfirm prøver er udført med kvalitetskontrol fra American Diagnostica Inc. Og to uafhængige laboratorier. Den samlede koefficient af afart (CV) for normalplasma var mindre end 4.0 % for DVVtest og 5.0% for DVVconfirm. For anormalt plasma var det samlede CV mindre end 6.5% for DVVtest og mindre end 5.0% for DVVconfirm.

Specificitet

DVVtest og DVVconfirm reagens var tested både ved brug af normal som anormal plasma som beskrevet nedenfor:

PLASMA Prøve	Positiv *DVVtest/DVVconfirm*
Lupus antikoagulant prøve	100% (17/17)
Normal plasma	2,1% (2/96)
Hepariniseret plasma	0% (0/2)
Factor mangel plasma	0% (0/8)
Factor VIII inhibitor plasma	0% (0/2)

REFERENCES

1. Harris, E. N., Asherson, R. A. and Hughes, G. R. V. Antiphospholipid antibodies - autoantibodies with a difference. *Ann Revs Med* 1988, 39: 261-271.
2. Conley, C. L and Hartmann, R. C. A hemorrhagic disorder caused by a circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1952, 31: 621-622.
3. Triplett, D. A., Brandt, J. T. and Maas, R. L. The laboratory heterogeneity of lupus -anticoagulants. *Arch Path Lab Med* 1985, 109: 946-951.

810-825CEFSD©ADI20070710

4. Thiagarajan, P., Shapiro, S. S. and DeMarco, L. Monoclonal immunoglobulin M lambda coagulation inhibitor with phospholipid specificity: Mechanism of a lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1980, 66: 397-405.
5. Brandt, J. T., Triplett, D. A., Alving, B. and Scharrer, I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants, an update: on behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulants/Antiphospholipid Antibodies of the ISTH *Thromb Haem* 1995, 74(6):1597-1603.
6. Exner, T., Papadopoulos, G. and Koutts, J. Use of a simplified dilute Russell viper venom time (dRVVT) confirms heterogeneity among 'Lupus Anticoagulants.' *Blood Coag Fibrinol* 1990, 1: 259-266.
7. Thiagarajan, P., Pengo, V. and Shapiro, S. S. The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. *Blood* 1986, 68: 869-874.
8. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays - Second Edition. *NCCLS Document H21-A2* December 1991, Vol. 11, No. 23.
9. Brandt, J. T. "Q & A". *CAP Today*, August 1992, Page 61.
10. Available from American Diagnostica GmbH, Kaplaneigasse 35, D-64319 Pfungstadt, Germany or your local Distributor
11. Passey, R. B. Walking the straight and narrow on quality control. *MLO* 1993, 2: 39-43.
12. Data on file, American Diagnostica Inc., Stamford, Connecticut 06902.

810-825CEFSD©ADI20070710